



TITLE:

膀胱癌におけるLaser scanning cytometryによるDNA ploidyの解析 : p53タンパクの過剰発現と7番染色体の異数性との関係について

AUTHOR(S):

川村, 研二; 池田, 龍介; 鈴木, 孝治

CITATION:

川村, 研二 ...[et al]. 膀胱癌におけるLaser scanning cytometryによるDNA ploidyの解析 : p53タンパクの過剰発現と7番染色体の異数性との関係について. 泌尿器科紀要 2000, 46(6): 377-383

ISSUE DATE:

2000-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/114304>

RIGHT:

膀胱癌における Laser scanning cytometry による DNA ploidy の解析 : p53 タンパクの過剰発現と 7 番染色体の異数性との関係について

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 鈴木孝治教授)

川村 研二, 池田 龍介, 鈴木 孝治

THE RELATIONSHIPS AMONG DNA PLOIDY TYPE DETERMINED BY LASER SCANNING CYTOMETRY, THE OVEREXPRESSION OF p53 PROTEIN AND THE NUMERICAL ABERRATIONS OF CHROMOSOME 7 IN BLADDER CANCER

Kenji KAWAMURA, Ryosuke IKEDA and Koji SUZUKI

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

The cellular DNA content of certain malignancies is regarded as a prognostic parameter. The mutant p53 is thought to destabilize centrosome replication, which leads to aberrant mitosis and chromosome instability. We investigated the relationship among DNA ploidy pattern type, numerical aberrations of chromosome 7 and p53 overexpression in 20 transitional cell carcinomas of the urinary bladder.

The DNA ploidy pattern type was determined by laser scanning cytometry, while p53 overexpression was investigated immunohistochemically. Using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific probes, the copy number of chromosome 7 was counted by touch preparations of interphase nuclei. The cytometric analysis revealed that the DNA patterns were highly correlated with both the numerical aberrations of chromosome 7 ($p=0.0002$) and the overexpression of p53. The incidences of p53 overexpression in DNA aneuploid tumors and DNA diploid ones were 78% and 10%, respectively ($p=0.0017$). Our results suggest that the overexpression of abnormal p53 protein induces DNA aneuploidy in bladder cancer.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 377-383, 2000)

Key words : DNA ploidy, Bladder cancer, Laser scanning cytometry, Chromosome 7, p53 protein overexpression

緒 言

前世紀末 Boveri によって、はじめて染色体異数性と癌との関連が提唱された。その中で Boveri は、異常増殖という癌の特性は染色体の欠損または獲得によって生じるという仮説をたてた¹⁾。実際、Bloom 症候群, ataxia telangiectasia, Li-Fraumeni 症候群, Werner 症候群などの遺伝的に染色体の不安定性が増加している疾患を持つヒトでは癌の発生率が非常に高いとされる²⁾。また、ほとんどの癌細胞は染色体異数性を示し、その程度は腫瘍の末期になるほど増加するとされている³⁾。

p53 遺伝子は細胞の増殖をコントロールする癌抑制遺伝子であり⁴⁾、ヒトの癌において最も変異している遺伝子である^{5,6)}。p53 の欠失または変異はある種の染色体不安定性、すなわち遺伝子増幅、染色体の倍数性の変化などと強い相関がある^{7,8)}。例えば、p53 の

欠失がある場合、遺伝子増幅の頻度は数百倍～数千倍に増加する⁹⁾。逆に腫瘍細胞に野性型 p53 を導入すると遺伝子増幅が抑制される⁹⁾。また、ヒトのさまざまな腫瘍の研究から p53 の変異または欠失と染色体異数性の発現との強い相関が示されている^{10,11)}。

膀胱癌は grade 1 : 表在性腫瘍のようなきわめて予後良好なものから、grade 3 : 浸潤性腫瘍のような予後不良のものまで、その悪性度・浸潤性は種々のものがある。これらの悪性度・浸潤性を規定する因子は、現時点では病理組織学的検討が中心である。膀胱癌の悪性度・浸潤性を規定する因子としては、染色体解析、フローサイトメトリー、細胞増殖因子、癌遺伝子と癌抑制遺伝子などが現在までに報告されてきている^{12,13)}。また、膀胱癌は他の多くの固形癌と同様に遺伝子異常の蓄積により¹⁴⁾、異常増殖ならびに浸潤性をしめすことが予想されている^{15,16)}。

今回われわれは、膀胱癌を対象に DNA ploidy, 7

番染色体の異数性, ならびに p53 タンパクの過剰発現の関係について検討したので報告する.

対象と方法

1997年12月から1999年6月までに手術した膀胱腫瘍20例を対象とした (Table 1). 対象は男性19例, 女性1例で年齢は49~83歳, 平均68.0歳であった. 手術方法は膀胱全摘除術9例, 経尿道的膀胱腫瘍切除術11例であり, 病理組織学的検討では, G1:4例 (pTa:4例), G2:8例 (pT1:5例, pT2:3例), G3:8例 (pT1:4例, pT2:3例, pT4:1例) であった. 検体は摘除後すぐに, 液体窒素で凍結し -80°C で保存した.

1. Leser scanning cytometry (LSC) 解析による DNA ploidy の検討

組織をシランコーティングスライドガラスに組織を押しつけ touch smear を作成した. 標本の固定は, 4°C, 100% エタノールで10分間行った. その後, RNase 200 mg/ml を含む propidium iodide (PI) 50 µg/ml で細胞核を染色し LSC を用いて DNA ploidy の解析を行った¹³⁾

PI により細胞核を染色した後, 10分で DNA histogram は安定した. そこで, PI 染色後10分以降に LSC で測定することにした. 1回の測定カウント数は5,000細胞以上を目標とした. 得られた DNA histogram は付属のプログラムで解析した¹⁷⁾

2. Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法

組織をシランコーティングスライドガラスに押しつけ touch smear を作成した. 30分間冷風風乾した後, 室温で 75 mM KCl に10分間浸漬して低張処理をした. その後, 4°C のカルノア固定液に10分間浸漬して固定し冷風乾燥させた. つぎに, PBS (-) に5分間浸漬し, 0.005% ペプシンで室温5分間処理し, エタノールで脱水乾燥させた. DNA プローブは7番染色体に特異的な α -サテライト特異的 DNA プローブ CEP7-Spectrum Orange (Vysis 社) を用いた. 染色体 DNA の変性は 75°C の変性溶液 (70% formamide/2XSSC) で5分間浸漬し, プローブ DNA の変性は 75°C 5分間行った. DNA 変性後のプローブと標本核 DNA を約16時間 42°C でハイブリダイズさせた. 対比染色は DAPI II (Vysis 社) を用い蛍光顕微鏡で X1,000油浸で観察した.

3. 組織免疫染色による p53 タンパクの解析

LSC を用いて DNA ploidy の解析を行った同じ標本に p53 タンパクの免疫染色を追加した. 前処置としてクエン酸バッファー内で電子レンジ 800 W で8分間3回の抗原賦活化処理を行った. その後, 内因性ペルオキシダーゼ阻害と正常ウシ血清アルブミンを反応させたが, 染色は envision (DAKO) を用いて行った. 一次抗体は p53 タンパク抗体 (DO-7, DAKO, USA) を使用した. 一次抗体の反応時間は 4°C, overnight とした. 発色には, 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC), 核染色にはヘマトキシリンを使用した. この染色標本を鏡検し, 腫瘍細胞をカウ

Table 1. The relationship among DNA ploidy, overexpression of p53 and numerical aberrations of chromosome 7

No.	年齢	性別	手術	悪性度	病期	DNA ploidy	p53 染色率	7 番染色体数
1	75	M	TUR	TCCG2	pT1N0M0	diploid	0.0	disomy
2	49	M	TOTAL	TCCG3	pT2N0M0	diploid	0.0	disomy
3	65	M	TOTAL	TCCG2	pT1N0M0	diploid	0.0	disomy
4	73	M	TOTAL	TCCG3	pT1pN0M0	diploid	0.5	disomy
5	65	F	TUR	TCCG1	pTaN0M0	diploid	1.0	disomy
6	76	M	TUR	TCCG2	6T1N0M0	diploid	1.0	di. & tri.
7	50	M	TUR	TCCG1	pTaN0M0	diploid	1.0	disomy
8	80	M	TUR	TCCG2	pT2N0M0	diploid	1.0	disomy
9	70	M	TUR	TCCG1	pTaN0M0	diploid	3.0	disomy
10	63	M	TOTAL	TCCG2	pT1pN0M0	diploid	69.0	disomy
11	79	M	TOTAL	TCCG3	pT1pN0M0	aneuploid	0.0	disomy
12	83	M	TOTAL	TCCG3	pT2pN0M0	aneuploid	0.0	tri. & tetra.
13	67	M	TOTAL	TCCG2	pT1pN0M0	aneuploid	20.0	trysomy
14	65	M	TUR	TCCG3	pT1N0M0	aneuploid	20.0	tri. & tetra.
15	51	M	TOTAL	TCCG3	pT2N0M0	aneuploid	21.0	tri. & tetra.
16	73	M	TUR	TCCG2	pT2N0M0	aneuploid	32.0	tri. & tetra.
17	80	M	TUR	TCCG3	pT1N0M0	aneuploid	34.0	tri. & tetra.
18	67	M	TOTAL	TCCG3	pT4pN3pM1	aneuploid	50.0	tri. & tetra.
19	60	M	TUR	TCCG2	pT2N0M0	aneuploid	65.0	tri. & tetra.
20	69	M	TUR	TCCG1	pTaN0M0	tetraploid	21.0	tetrasomy

TOTAL: total cystectomy, TUR: transurethral resection of bladder tumor, TCC: transitional cell carcinoma.

ントし, そのうちの陽性細胞の占める割合を labeling index (以下 LI と略す) として算出した. p53 タンパクの過剰発現は LI : 20% 以上を陽性と定義した. また, 陰性コントロールとして一次抗体のかわりに Mouse Ig G2a (negative control: Oncogene) を使用した.

4. LSC による p53 タンパクの細胞周期ごとの発現の解析

LSC は, スライドガラス上に静置された細胞集団をレーザーで高速走査する装置である. スライドガラス標本を用いることにより, 顕微鏡にて形態観察が可能であるといった特徴を持っている^{13,17)} LSC を用いて DNA ploidy の解析を行った同じ標本に p53 タンパクの免疫染色を追加することにより, それぞれの細胞を画面上に呼び出し, その細胞が p53 タンパク陰性か陽性か判断することができる. すなわち, 細胞周期ごとの p53 タンパクの発現を検討することが可能である. p53 タンパクの発現を認めた症例において LSC を用いて p53 タンパクの細胞周期ごとの発現を検討した. 統計解析はカイ 2 乗検定を用いた.

結 果

1 Leser scanning cytometry (LSC) 解析による DNA ploidy の検討

全例で DNA 量の測定が可能であり, 変動係数は 2.5 から 7.0 で平均 4.4 であった. DNA diploid を 20 例中 10 例, DNA aneuploid を 20 例中 9 例, DNA tetraploidy を 20 例中 1 例に認めた. DNA ploidy と腫瘍の悪性度の関係を Table 2 に示す

2. Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法

Table 2. The correlation between DNA ploidy and the tumor grade: The DNA content did not correlate with the tumor grade (χ^2 test, $p=0.0651$: DNA diploid tumors vs. DNA aneuploid tumors)

DNA ploidy	n	G1	G2	G3
DNA diploid	10	3	5	2
DNA aneuploid	9	0	3	6
DNA tetraploid	1	1	0	0

Table 3. The correlation between DNA ploidy and numerical aberrations of chromosome 7: The cytometric analysis of DNA content highly correlated with the numerical aberrations of chromosome 7 (χ^2 test, $p=0.0002$: DNA diploid tumors vs. DNA aneuploid tumors)

DNA ploidy	n	Disomy	N.A. of Ch. 7	p	dis. & tri.	Trisomy	tri. & tetra.	Tetrasomy
DNA diploid	10	9	1	0.0002	1	0	0	0
DNA aneuploid	9	1	8		0	1	7	0
DNA tetraploid	1	0	1		0	0	0	1

N.A. of Ch. 7: the numerical aberrations of chromosome 7.

DNA ploidy と 7 番染色体の異数性の関係について Table 3 に示す. DNA diploid では, 10 例中 9 例が 7 番染色体は disomy であり 1 例のみ 7 番染色体が disomy と trisomy が混在する症例を認めた. DNA aneuploid では, 9 例中 8 例が trisomy または trisomy と tetrasomy が混在するパターンであり, 1 例のみ 7 番染色体が disomy の症例を認めた. DNA tetraploid の 1 例は 7 番染色体は tetrasomy であった. DNA diploid では 7 番染色体は disomy をしめし, DNA aneuploid では trisomy または trisomy と tetrasomy を示し, DNA aneuploid において 7 番染色体の異数性を認める率が高かった (カイ 2 乗値 = 13.51, $df=1$, $p=0.0002$).

3. 組織免疫染色による p53 タンパクの解析

DNA ploidy と p53 タンパクの過剰発現の関係について Table 4 に示す. DNA diploid 群では 10 例中 9 例が LI : 0 ~ 3 % と p53 タンパク陰性であったが, 1 例のみ 69 % と陽性の症例を認めた. DNA aneuploid では, 9 例中 7 例に p53 タンパクの過剰発現を認めた. DNA tetraploid の 1 例も p53 タンパク 20 % の染色率であった. DNA diploid では p53 タンパク陰性が 90 % であり, DNA aneuploid では p53 タンパク陽性が 77.8 % であり, 明らかに DNA aneuploid tumor で p53 タンパク陽性率が高かった (カイ 2 乗値 = 9.83, $df=1$, $p=0.0017$).

4. LSC による p53 タンパクの細胞周期ごとの発現の解析

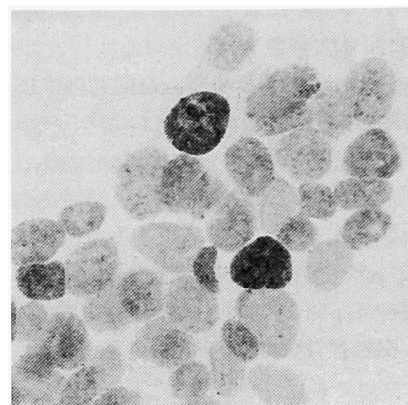
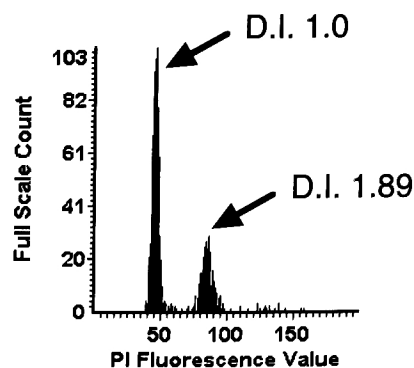
Fig. 1 に DNA aneuploid の症例 (transitional cell carcinoma: TCC, G2, pT2, 症例 16) を示す. DNA index 1.89 の aneuploid peak を持つ腫瘍であるが, 7 番染色体の数的異常を認め tetrasomy と trisomy の混在するパターンであった. 図には 7 番染色体のスポットが 4, 3, 5 と不安定である部位を示す. また, p53 タンパク陽性であり, 塩基配列の解析¹²⁾では, exon7, codon249 の Arg (GGA) が Ser (TGA) となっており point mutation を認めた. この症例において LSC を用いて p53 タンパクの細胞周期ごとの発現の解析を行った. Propidium iodide fluorescence peak の high peak の部位にリンパ球を確認できこれを内部標準として DNA index 1.0 を決

Table 4. The correlation between DNA ploidy and the overexpression of p53: the cytometric analysis of DNA content highly correlated with the overexpression of p53 (χ^2 test, $p=0.0017$: DNA diploid tumors vs. DNA aneuploid tumors)

	p53 陰性	p53 陽性	p
DNA diploid	9 (90%)	1 (10%)	0.0017
DNA aneuploid	2 (22%)	7 (78%)	
DNA tetraploid	0 (0%)	1 (100%)	

定した。DNA aneuploid の症例においては、DI 1.89 の DNA aneuploid のピークが確認でき、その $4n$ (G2M 期) である DI 3.78 の部位に大きな腫瘍細胞を確認できた (Fig. 2)。グラフ上のそれぞれの細胞をコンピュータ画面上で呼び出し、腫瘍細胞の形態観察が可能であり p53 タンパクの陽性率を検討できた。Table 5 に細胞周期毎の p53 タンパクの染色率を示す。DNA aneuploid では、DNA diploid の population があまり染色されず DNA aneuploid の population に p53 タンパクが染色されるものを 7 例中 5 例に認めた。DNA diploid の population も染色されたほかの 2 例は DNA diploid の population と DNA aneuploid の population が均一に染色されるものが 1 例、もう 1 例は DNA diploid の population において G2M 期に特異的に染色される症例であった。

DNA tetraploidy では、DNA tetraploidy の population に選択的に染色された。DNA tetraploidy では、小型の細胞である early G1 期に p53 タンパク陽性細胞を多く認めた。一方 DNA aneuploid では S 期から G2 期に染色率のピークがあり大型の細胞に p53 タンパク陽性細胞を多く認める傾向があった。



FISH CEP7

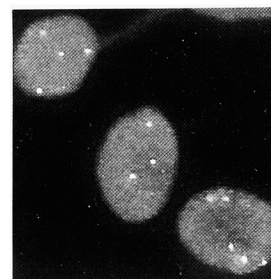


Fig. 1. The case of p53 protein positive: DNA aneuploid case (TCC G2, case 16).

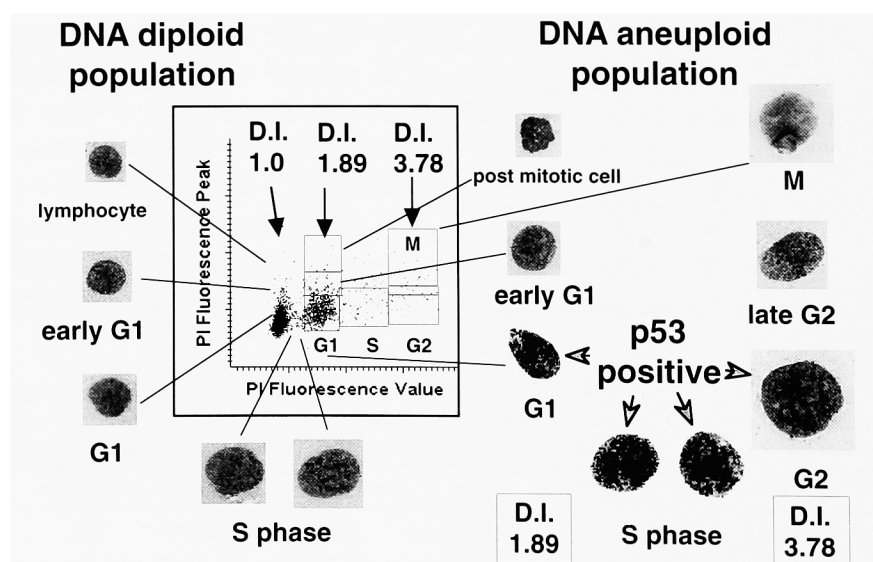


Fig. 2. The relationship among fluorescence value, fluorescence peak, and nuclear morphology. LSC shows the p53 protein expression during the cell cycle in a bladder tumor: DNA aneuploid case (TCC G2, case 16).

Table 5. LI of P53 proteins in each phase of a cell cycle

No.	DNA ploidy	CEP 7	DNA diploid population								DNA aneuploid population							
			p.m.c.	Early G1	G1	Early S	Late S	G2	Late G2	M	p.m.c.	Early G1	G1	Early S	Late S	G2	Late G2	M
9	diploid	disomy	0.0	2.0	3.0	10.0	0.0	0.0										
10	diploid	disomy	10.0	8.0	9.0	45.0	55.0	27.5	66.6	0.0								
13	aneuploid	trisomy	0.0	0.0	0.0	0.0				0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	21.0	0.0	0.0	0.0
14	aneuploid	tri. & tetra.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			26.3	25.0	38.0	43.8	33.3	16.7	33.3	25.0	25.0
15	aneuploid	tri. & tetra.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.6	10.0		5.0	7.0	4.0	13.0	3.8	0.0	0.0	0.0
16	aneuploid	tri. & tetra.	2.0	4.0	0.0	4.0	8.0			4.0	6.0	5.0	33.0	23.0	33.0	25.0	25.0	25.0
17	aneuploid	tri. & tetra.	6.0	10.0	34.0	30.0	30.0			20.0	34.0	42.0	48.0	60.0	70.0	36.0	16.0	16.0
18	aneuploid	tri. & tetra.	0.0	3.4	7.9					12.1	22.2	16.0	22.2	33.3	33.3	40.0	0.0	0.0
19	aneuploid	tri. & tetra.	0.0	1.0	2.0					17.4	23.0	35.0	36.0	42.6	48.0	11.8	37.5	37.5
20	tetraploid	tetrasomy	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			12.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

p.m.c.: post mitotic cells.

考 察

膀胱癌の染色体数の異常について, 細胞分裂間期細胞核で FISH 法を用いた検討がなされており, 1, 7, 9番, 11, 17番の数的異常が比較的高頻度におこる異常として報告されている^{18,19)}. 今回, DNA aneuploid と 7 番染色体の異数性の間に強い相関を得たが, Waldman ら¹⁸⁾は膀胱癌において 7 番の染色体の数的異常は癌細胞の悪性度や組織深達度と良く相関していると報告している. 7 番染色体には epidermal growth factor (EGF) が存在しその数的増加が腫瘍細胞の増殖能, 浸潤能に関与している可能性が示唆されている. Duesberg¹⁾は染色体の数的増加により正常遺伝子の量的な増加が生じ癌化すると説明している. 染色体の異常獲得もしくは欠損は, 癌遺伝子の活性化もしくは癌抑制遺伝子の欠失に関連すると考えられ, 発癌との関連が強く示唆される¹⁹⁾

また, 今回の結果では, p53 タンパク過剰発現の症例に DNA aneuploid と 7 番染色体の異数性を認める傾向があった. これに関しては最近, p53 が G2/M チェックポイントにも関わっているという予測が証明されている. 14-3-3 δ 遺伝子が p53 によって転写誘導されることがわかり, 発現された 14-3-3 δ タンパクが Cdc25C ホスファターゼというタンパクを細胞核から細胞質へ移行させることによって M 期への進行を阻止し, 細胞を G2 消に停止させることが示された²⁰⁾ p53 の異常が G2/M チェックポイント機能を障害し, 染色体異数性を生じさせる可能性が考えられる.

また, p53 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞では培養してから数回の分裂を過ごただけで異常な中心体 (centrosome) 数を示す^{10,11)} 染色体は紡錘糸の端に結合し, 細胞の中央に並んだのちに両極の中心体に向かって移動して 2 つに分配される. この制御機構に異常が起これば癌細胞特有の染色体数の異常が観察されることとなる. p53 は染色体分配に主要な役割を果たす中心体の数を決定する制御因子の一つであるといわれ^{10,11,20)} p53 の異常が染色体数を不安定化させ癌化への潜在能力を高めることになると考えられる^{10,11)} 膀胱癌においてもこの染色体の異数性が癌化に大きく関与している可能性が指摘されている^{15,16,18)}

細胞周期ごとの p53 タンパクの解析については, DNA aneuploid 例の DNA diploid population より DNA aneuploid population の方が p53 タンパク陽性率が高いと報告されている²¹⁾ 今回の p53 タンパクの細胞周期ごとの染色率の解析において, 特徴的であったのは, 1. DNA aneuploid 例において DNA diploid population より DNA aneuploid population の方が p53 タンパク陽性率が高い傾向を認めた. 2.

DNA aneuploid 例では G1 期から S 期, さらに G2 期にかけて p53 の染色率が上昇している症例を多く認めた。3. DNA tetraploid 例では, 小型の細胞である early G1 期に p53 タンパク陽性細胞を多く認めたことである。特に, DNA tetraploid で early G1 期に p53 タンパク陽性細胞を多く認めたことと, DNA aneuploid 例で S 期から G2 期の細胞に p53 タンパク陽性細胞を認めたことは相反する結果の様に思われる。これらのことにどのような意味があるのかは不明である。しかし, DNA tetraploid の症例は, 核が均一で病理診医は移行上皮癌 G1 と判断しており, また, 染色体 7 番もスポットが 2 個と 4 個に正確にわかれており, 有糸分裂が一応安定していると考えられる。それに比べて, DNA aneuploid では, 有糸分裂は不安定になっており, 例えば 7 番染色体数は, 3 個から 5 個の間で不安定になっている症例を認めた。今後, p21 などとの細胞周期上での関係, さらには変異型 p53, 野生型 p53 の細胞周期における発現などを検討していく必要があると考えている。

染色体の不安定性は多くの癌細胞に見いだされる共通の特徴である。均等な染色体分配を維持する監視機構(スピンドルチェックポイント)の失活が, 染色体数の異常を引き起こし, 癌化, あるいは癌進行に深く関連する可能性が示唆されてきている^{22,23)}。膀胱癌では, 組織学的に grade 3: 浸潤性腫瘍において高率に DNA aneuploid を認め, 膀胱癌悪性度診断上, また予後因子として極めて重要な検査法であることが報告されており^{15,16,24)}, 今後, スピンドルチェックポイントの解析が膀胱癌において重要になってくると考える。

結 語

膀胱癌において p53 タンパクの過剰発現と染色体 7 番の異常, ならびに DNA aneuploidy に相関を認めた。したがって p53 の異常が染色体数の異常にかかわっている可能性があると考ええる。

文 献

- 1) Duesberg: Are Centrosomes or Aneuploidy the key to Cancer? *Science* **284**: 2091-2092, 1999
- 2) Cheng KC and Loeb JC: Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv Cancer Res* **60**: 121-156, 1993
- 3) Ohshima M and Barrett JC: Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Mutat Res* **8**: 129-159, 1986
- 4) Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, et al.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**: 80-83, 1992
- 5) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al.: p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53, 1991
- 6) Levine AJ, Momand J and Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**: 453-456, 1991
- 7) Purdie CA, Harrison DJ, Peter A, et al.: Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene* **9**: 603-609, 1994
- 8) Harvey M, McArthur, Montgomery CA Jr, et al.: Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature Genet* **5**: 225-229, 1993
- 9) Livingstone LR, White A, Sprouse J, et al.: Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wildtype p53. *Cell* **70**: 923-935, 1992
- 10) Fukasawa K, Wieener F, Vande Woude GF, et al.: Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient mice. *Oncogene* **15**: 1295-1302, 1997
- 11) Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, et al.: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271**: 1744-1747, 1996
- 12) 川村研二, 池田龍介, 鑑木孝治: 尿路上皮癌における MDM2 の過剰発現について. *金沢医大誌* **23**: 146-151, 1998
- 13) Kawamura K, Tanaka T, Ikeda R, et al.: DNA ploidy analysis of urinary tract epithelial tumors by laser scanning cytometry. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, **22**: 26-30, 2000
- 14) Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767, 1990
- 15) 橘 政明: 膀胱癌の悪性度 浸潤性判定のための細胞生物学的アプローチ *日泌尿会誌* **87**: 629-642, 1996
- 16) 寛 善行: 膀胱癌の遺伝子異常. *腎と透析* **42**: 393-396, 1997
- 17) Sasaki K, Kurose A, Miura Y, et al.: DNA ploidy analysis by Laser scanning cytometry (LSC) in colorectal cancers and comparison with flow cytometry. *Cytometry* **23**: 106-109, 1996
- 18) Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, et al.: Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res* **51**: 3807-3813, 1991
- 19) 松山豪泰, 吉 弘悟, 内藤克輔: 前立腺癌の遺伝子診断—FISH を用いたヒト染色体解析の意義. *西日泌尿* **61**: 209-216, 1999
- 20) Kumagai A, Yakowec PS and Dunphy WG: 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* **9**: 345-354, 1998
- 21) 市川 明, 五十嵐誠治: フローサイトメーターに

- よる p53 タンパクの解析. 臨検 **41** : 1161-1165, 1997
- 22) Cahill DP, Lengauer C, Yu J, et al. : Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392** : 300-303, 1998
- 23) Li Y and Benezra R : Identification of a human mitotic checkpoint gene; hsMAd2. *Science* **274** : 246-248, 1996
- 24) 中出忠宏, 池田龍介, 津川龍三 : 膀胱腫瘍における PCNA, p53 タンパクの発現および p53 遺伝子変異と生物学的悪性度についての検討. 金沢医大誌 **22** : 196-202, 1997

(Received on October 13, 1999)

(Accepted on March 14, 2000)